

Título em Português:	Caracterização da estrutura da L-galactono-1,4-lactona desidrogenase com FAD e sua função na síntese do ácido L-ascórbico de Myrciaria Dubia
Título em Inglês:	**Translation:** "Characterization of the structure of L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase with FAD and its function in the synthesis of L-ascorbic acid from Myrciaria Dubia."
Autor:	Jorge Arthur da Gama Cândido Chagas
Instituição:	Universidade de São Paulo
Unidade:	Instituto de Física de São Carlos
Orientador:	Andre Luis Berteli Ambrosio
Área de Pesquisa / SubÁrea:	Química de Macromoléculas
Agência Financiadora:	USP - Programa Unificado de Bolsas

Caracterização da estrutura da L-galactono-1,4-lactona desidrogenase com FAD e sua função na síntese do ácido L-ascórbico de *Myrciaria Dubia*

Autor: Jorge Arthur da Gama Cândido Chagas

Colaborador: Jhon Antoni Vargas Santillan

Orientador: André Luis Berteli Ambrosio

Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo

j.arthurcandido@usp.br

Objetivos

O objetivo geral deste trabalho é descrever a estrutura tridimensional da L-galactono-1,4-lactona desidrogenase (*MdGalDH*) em complexo com FAD e caracterizar suas propriedades biofísicas e bioquímicas. Os objetivos específicos são purificar a *GalDH* recombinante com protocolos otimizados; avaliar suas propriedades bioquímicas e biofísicas na presença e ausência do FAD; cristalizar o complexo *GalDH*–FAD por co-cristalização e *soaking*; e, por fim, obter um modelo cristalográfico de alta resolução do complexo *GalDH*–FAD.

Métodos e Procedimentos

O vetor pET28a+ contendo o inserto de *MdGalDH* foi propagado em *Escherichia coli* DH5α para amplificação do plasmídeo e, posteriormente, utilizado para transformar células *E. coli* Rosetta (BL21/DE3), empregadas como hospedeiras para a expressão da proteína recombinante, induzida com 0,3 mM IPTG a 18 °C. A proteína foi purificada por cromatografia de afinidade, seguida de troca iônica e exclusão por tamanho, tendo sua expressão e pureza verificadas por SDS-PAGE e a concentração determinada por espectrofotometria. O peso molecular e o estado oligomérico foram analisados por cromatografia de exclusão molecular acoplada a espalhamento de luz multiângulo (SEC-MALS), enquanto o enovelamento e a estabilidade foram avaliados por dicroísmo circular (CD) em um

espectropolarímetro Jasco J-815. Os ensaios de cristalização foram conduzidos manualmente a partir da replicação de uma condição previamente identificada no kit PACT, variando-se a concentração de proteína e a temperatura, e a coleta de dados de difração de raios X foi realizada exclusivamente na linha de luz **MANACÁ** do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS–CNPEM), sendo os dados processados e analisados com os pacotes CCP4 e Phenix.

Resultados

A expressão da proteína *MdGalDH* foi bem-sucedida, resultando em uma forma solúvel e estável. A massa molecular determinada por SEC-MALS foi de 60,7 kDa, valor muito próximo ao teórico de ~61 kDa, confirmando que a proteína é monomérica. A purificação inicial por cromatografia de afinidade produziu uma amostra de coloração amarelada, característica da presença do cofator FAD; entretanto, foi necessária uma etapa adicional de cromatografia de troca iônica para separar duas populações distintas, correspondentes à forma oxidada (amarela) e à reduzida (incolor). Além disso, foram obtidos cristais da *MdGalDH* em condições reproduzidas a partir do kit PACT, embora os dados de difração ainda não tenham sido coletados.

Conclusões

Este trabalho resultou na otimização do processo de purificação da MdGalDH, permitindo a separação clara das formas oxidada e reduzida e confirmando seu estado monomérico em solução. Essa estratégia refinada viabilizou a obtenção de cristais estáveis e reprodutíveis, adequados tanto para coleta de dados de difração quanto para ensaios de *soaking*. Apesar desse avanço experimental, não foi ainda possível obter dados estruturais do complexo com FAD, o que nos levou a complementar a análise por meio de modelagem computacional utilizando AlphaFold.

Referências

- [1] VARGAS, J.A. Caracterização estrutural de três enzimas com potencial uso biotecnológico da rota biossintética D-manose/L-galactose do ácido L-ascórbico de *Myrciaria dubia* “camu-camu”. 2023. Dissertação (Mestrado em Ciências) - IFSC/USP, São Carlos.
- [2] VARGAS, J.A., Sculaccio, S.A. *et al.* Structural insights into the Smirnoff–Wheeler pathway for vitamin C production in the Amazon fruit camu-camu. *Journal of Experimental Botany*, Volume 75, Issue 9, 3 May 2024, Pages 2754–2771.
- [3] LEFERINK, Nicole G. H. *et al.* Functional assignment of Glu386 and Arg388 in the active site of L-galactono- γ -lactone dehydrogenase. *FEBS Letters*, v. 583, n. 19, p. 3199-3203, 2009.
- [4] LEFERINK, Nicole G. H. *et al.* L-Galactono-c-lactone dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*, a flavoprotein involved in vitamin C biosynthesis. *The FEBS Journal* 275 (2008) 713–726
- [5] W. FRAAIJE, Marco *et al.* Structural Analysis of Flavinylation in Vanillyl-Alcohol Oxidase. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 275, No. 49, Issue of December 8, pp. 38654 –38658, 2000
- [6] AbOOBUCKER, Siddique I., LORENCE, Argelia. Recent progress on the characterization of aldonolactone oxidoreductases.

Characterization of the L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase structure with FAD and its function in the L-ascorbic acid synthesis of *Myrciaria dubia*

Jorge Arthur da Gama Cândido Chagas

Collaborator: Jhon Antoni Vargas Santillan

Supervisor: André Luis Berteli Ambrosio

Physics Institute of São Carlos, University of São Paulo

j.arthurcandido@usp.br

Objectives

The general objective of this work is to describe the three-dimensional structure of L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase (MdGalDH) in complex with FAD and to characterize its biophysical and biochemical properties. The specific objectives are to purify recombinant GalDH using optimized protocols; to evaluate its biochemical and biophysical properties in the presence and absence of FAD; to crystallize the GalDH–FAD complex by co-crystallization and immersion; and, finally, to obtain a high-resolution crystallographic model of the GalDH–FAD complex.

Materials and Methods

The pET28a+ vector containing the MdGalDH insert was propagated in *Escherichia coli* DH5 α for plasmid amplification and subsequently used to transform *E. coli* Rosetta (BL21/DE3) cells, which were used as hosts for recombinant protein expression, induced with 0.3 mM IPTG at 18 °C. The protein was purified by affinity chromatography, followed by ion exchange and size exclusion. Expression and purity were verified by SDS-PAGE, and concentration was determined by spectrophotometry. Molecular

weight and oligomeric state were analyzed by size exclusion chromatography coupled with multi-angle light scattering (SEC-MALS), while folding and stability were assessed by circular dichroism (CD) on a Jasco J-815 spectropolarimeter. The crystallization tests were conducted manually by replicating a condition previously identified in the PACT kit, varying the protein concentration and temperature. X-ray diffraction data were collected exclusively at the MANACÁ beamline of the National Synchrotron Light Laboratory (LNLS–CNPEM). The data were processed and analyzed using the CCP4 and Phenix packages.

Results

The expression of the MdGalDH protein was successful, resulting in a soluble and stable form. The molecular mass determined by SEC-MALS was 60.7 kDa, very close to the theoretical value of ~61 kDa, confirming that the protein is monomeric. Initial purification by affinity chromatography produced a yellowish sample, characteristic of the presence of

the FAD cofactor; however, an additional ion-exchange chromatography step was necessary to separate two distinct populations, corresponding to the oxidized (yellow) and reduced (colorless) forms. Furthermore, crystals of MdGalDH were obtained under conditions reproduced using the PACT kit, although diffraction data have not yet been collected.

Conclusions

This work resulted in the optimization of the MdGalDH purification process, allowing the clear separation of the oxidized and reduced forms and confirming its monomeric state in solution. This refined strategy enabled the production of stable and reproducible crystals, suitable for both diffraction data collection and soaking tests. Despite this experimental advance, it was not yet possible to obtain structural data from the FAD complex, which led us to supplement the analysis through computational modeling using AlphaFold.

References

- [1] VARGAS, J.A. Caracterização estrutural de três enzimas com potencial uso biotecnológico da rota biossintética D-manose/L-galactose do ácido L-ascórbico de *Myrciaria dubia* “camu-camu”. 2023. Dissertação (Mestrado em Ciências) - IFSC/USP, São Carlos.
- [2] VARGAS, J.A., Sculaccio, S.A. *et al.* Structural insights into the Smirnoff–Wheeler pathway for vitamin C production in the Amazon fruit camu-camu. *Journal of Experimental Botany*, Volume 75, Issue 9, 3 May 2024, Pages 2754–2771.
- [3] LEFERINK, Nicole G. H. *et al.* Functional assignment of Glu386 and Arg388 in the active site of L-galactono- γ -lactone dehydrogenase. *FEBS Letters*, v. 583, n. 19, p. 3199-3203, 2009.
- [4] LEFERINK, Nicole G. H. *et al.* L-Galactono- γ -lactone dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*, a flavoprotein involved in vitamin C biosynthesis. *The FEBS Journal* 275 (2008) 713–726
- [5] W. FRAAIJE, Marco *et al.* Structural Analysis of Flavinylation in Vanillyl-Alcohol Oxidase. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 275, No. 49, Issue of December 8, pp. 38654 –38658, 2000
- [6] ABOOBUCKER, Siddique I., LORENCE, Argelia. Recent progress on the characterization of aldono-lactone oxidoreductases.